

SEPARATION OF PLASMA

Reference (5)

Patent number: JP62067456
Publication date: 1987-03-27
Inventor: MANABE SEIICHI; IJIMA HIDEKI
Applicant: ASAHI CHEMICAL IND
Classification:
- international: A61M1/02; A61M1/34; B01D13/00; B04B5/00;
G01N33/48
- european:
Application number: JP19850206398 19850920
Priority number(s): JP19850206398 19850920

Report a data error here

Abstract of JP62067456

PURPOSE: To separate plasma component free from no microorganism particle such as virus without being heated, by performing an ultra filtration of the plasma component simultaneously with a centrifugal separation by a cupro- ammonium cellulose hollow system. **CONSTITUTION:** A porous cupro-ammonium cellulose porous hollow fiber with the average pore size of 0.02μm to 0.2μm exceeding 10% in the surface vacancy rate is arranged to be aligned in the fiber axial direction with the direction of a centrifugal force and blood components are separated and fractioned by the centrifugal force as driving force while being filled with a fluid to be filtered or already filled therewith. To be more specific, cupro-ammonium cellulose hollow fibers are bundled and bonded inside a container (cylindrical) with an adhesive to form a liquid separator (module). Then, the module thus obtained is so set in a centrifugal machine that a centrifugal force is applied in the axial direction of the hollow fiber. In the module, inflow and outflow ports of a liquid to be filtered lead to the inside of the hollow fiber (hollow section) and a blood is made to flow in at the inflow port to be given the centrifugal force. Then, a filtrate is recovered from a container provided at the outflow port.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-67456

⑮ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)3月27日

G 01 N 33/48

D-8305-2G

A 61 M 1/02

7720-4C

1/34

7720-4C

B 01 D 13/00

R-8014-4D

B 04 B 5/00

Z-6703-4D

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 血漿分離方法

⑰ 特 願 昭60-206398

⑱ 出 願 昭60(1985)9月20日

⑲ 発 明 者 真 鍋 征 一 高槻市八丁畷町11番7号 旭化成工業株式会社内

⑲ 発 明 者 飯 島 秀 樹 高槻市八丁畷町11番7号 旭化成工業株式会社内

⑲ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

明 細 書

1 発明の名称

血漿分離方法

2 特許請求の範囲

遠心分離による血漿分離方法において、平均孔径が $0.02 \sim 0.2 \mu m$ で面内空孔率が10%以上の銅安セルローズ多孔性中空繊維の繊維軸方向を遠心力の方向にそろえ、被処理流体を中空繊維に充填しつつ、または充填した状態で遠心力を駆動力として血液成分を分離分画することを特徴とする血漿分離方法

3 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、血漿分離方法に関する。更に詳しくは血液中より、ウイルス等の微生物粒子を混入しない血漿成分を分離する方法に関するものであり、血液を遠心分離法によつて血球成分と血漿成分とに分離する過程において、この分離と同時に血漿成分を銅安セルローズ中空糸によつて限外濾過することによつてウイルス等の微生物粒子を混入しない血

漿成分を分離する方法に関するものである。

人間を含めた動物の血液より血球成分を除去して得られる血漿は、そのまま血漿交換療法用の血漿、成分輸血用の血漿製剤、血漿分画製剤の原料(人間の血液の場合)あるいは組織培養液(動物の血液)、あるいは遺伝子工学で利用される試薬(動物の血液)に利用される。これらの利用の際、加熱により滅菌処理することが不可能な場合が多い。この場合には、血漿中からウイルス等の微生物粒子の除去が要求される。

従来の技術

従来、血液中より血漿を分離する方法として、遠心分離法および高分子膜による濾過法が採用されていた。遠心分離法では、工業的な用途(血漿分画製剤用など)では装置が大型で経費も高く、血清肝炎ウイルスの混入を完全には防止できない。また、この方法では血小板が混入する恐れもある。一方、高分子膜による分離では、装置として小型であること、採血現場での分離の可能性、あらゆる種類の分画分子量成分の回収の可能性、ウイル

スの除去が \bullet されている。しかし、実際はタンパク質の回収率が低く、目づまりのため使用中に逕過速度が急速に低下する。特に凝固因子の回収には微生物の混入を完全に避けねばならないが、従来の高分子膜による逕過法では、この要求は完全には満足されていない。ウイルス分離除去を目的とした逕過では逕過速度が小さく実用的ではない。そのため、高分子膜による血液逕過は工業的には利用されていない。

血漿成分中に混入したウイルスの除去方法としては、上記の膜分離、金属-ウイルス複合体を形成させた沈殿法、活性炭素を使用した吸着法、ゲル逕過法が知られている。沈殿法では沈殿物の回収のための工程を必要とし、さらに連続的な除去は困難である。吸着法、ゲル逕過法が適用出来るウイルスの範囲は限られており、また混入したウイルス粒子数が多い場合、適用が難しい。

発明が解決しようとする問題点

本発明は遠心分離法および限外逕過法の両者の利点を持ち、しかも、それぞれの方法の欠点を除

ここで多孔性中空繊維とは、走査型電子顕微鏡で内壁、外壁のいずれの面でも孔が明瞭に認められる中空繊維である。

本発明方法における分離方法には、遠心分離による血球成分と血漿成分との分離と、流体にかかる遠心力を静水圧として、多孔性中空繊維による限外逕過法でのウイルス等の微生物粒子を血漿成分から除去する分離との両者を同時に実施する点に特徴がある。

本発明の特徴の1つは、銅安セルロースを素材高分子として採用する点にある。タンパク質と高分子素材との吸着性に関する相関性を検討した結果、一般的には親水性素材ほどタンパク質の吸着性が少ないことが明らかとなつた。親水性素材としてセルロースが優れている。ここでセルロースとは、いわゆる再生セルロースを意味する。再生セルロースより構成される多孔性中空繊維は、セルロース誘導体(通常セルロースアセテート)多孔性中空繊維をケン化処理するか、あるいは銅安法で直接中空繊維を紡糸する方法で作製される。

去した血漿分離方法であり、且つ回収される血漿タンパク質中にはウイルス粒子は存在せずそのため加熱滅菌処理を必要としない。特に第8および第9凝固因子の分離回収用の血漿を得る方法を提供するものである。

問題点を解決するための手段

本発明は遠心分離による血漿分離方法において、平均孔径が $0.02\ \mu\text{m} \sim 0.2\ \mu\text{m}$ で面内空孔率が10%以上の銅安セルロース多孔性中空繊維の繊維軸方向を遠心力の方向にそろえ、被逕過流体を中空繊維に充填しつつ、または充填した状態で遠心力を駆動力として血液成分を分離分画することを特徴とする血漿分離方法である。

本発明の血漿分離分画方法は、上記、特定の平均孔径範囲と特定の面内空孔率を持つ銅アンモニウム法セルロース(銅安セルロースと略称)多孔性中空繊維の繊維軸方向を遠心力の方向にそろえ、血液を該中空繊維内部に充填しつつ、あるいは充填した状態で、遠心力を駆動力として、血液成分を分離分画する方法で構成される。

これらの2種の再生セルロース多孔性中空繊維間でタンパク質の吸着性を比較した結果、セルロース誘導体多孔性中空繊維をケン化処理したものの方が吸着性が大きい。また銅安法再生セルロースは、生体への適合性、力学的強靱性において優れ、しかも同一の空孔率で比較した際、限外逕過速度が大きい。また蒸気滅菌に伴う平均孔径の変化が小さい。銅安セルロースのセルロースの粘度平均分子量は 7×10^4 以上が好ましい。また0.1 N NaOH 水溶液中へ溶解する成分が少なければ少ないほど好ましく、40℃ 48時間0.1 N NaOH 水溶液中に浸漬した際、この溶解成分が0.001%以下であれば、血漿中より微生物除去用として最適である。このような銅安セルロース中空繊維は、高純度のセルロース原料より銅安セルロース溶液を作製する際に、セルロースの化学的な分解をおさえ、異物の混入を防止するために超純水を用いるなどの注意を要する。

本発明方法の第2の特徴は、平均孔径〔後述の4次の平均孔半径 $2\bar{r}_4$ (\bar{r}_4 は4次の平均孔半径を

本発明では（孔径と略称）が $0.02 \sim 0.2 \mu\text{m}$ で、面内空孔率が 10% 以上の多孔性中空繊維を用いる点にある。本発明でいう多孔性中空繊維とは、中空繊維の壁厚部を電子顕微鏡で観察した際、内外壁厚部全面において、 $0.02 \mu\text{m}$ 以上の孔が認められる中空繊維を意味する。平均孔径が $0.02 \mu\text{m}$ 未満であれば、限外濾過速度が極端に小さく、また水溶液中に溶解しているタンパク質を濾液としての回収率が著しく低下する。例えば、血清アルブミンでは、回収率が 5% 未満となる。従つて、平均孔径は、微生物粒子が除去可能な範囲で大きければ大きいほど良いが、限外濾過時に被濾過流体の供給回路からの微生物粒子による汚染を避けるため、 $0.2 \mu\text{m}$ 以下であることが必要である。もし B 型肝炎ウイルスの存在の可能性がある場合には平均孔径として $0.04 \mu\text{m}$ 以下、ATL、ウイルスの存在の可能性がある場合には平均孔径は $0.1 \mu\text{m}$ 以下である。また微生物の分離除去を目的とする際、多孔性中空繊維の面内空孔率は 10% 以上必要である、10% 未満では限外濾過速度は急

急速に小さくすることが出来る。

本発明方法の第 3 の特徴は、物質分離の駆動力として遠心力を駆動力とした限外濾過を行なう点にある。中空繊維内部の被濾過流体中には大小さまざまな粒子成分が存在する。粒子の密度は、一般に媒体（水）の密度に比べて大きい。そのため遠心力を負荷した初期には、密度が大きく、質量の大きな粒子成分が選択的に中空繊維の中空部内で遠心力の方向に沿つて移動する。この移動速度を大きくし、さらに移動中の粒子と中空繊維の中空部を形成する内壁部との衝突の確率を低下させるため、中空繊維の繊維軸方向を遠心力の方向にそろえることが必要である。両者の方向の平行性が十分でないと粒子の上述の移動速度の低下のみでなく、粒子成分の損傷が顕著となる（血液の場合、溶血など）、遠心力の負荷の初期には粒子成分の遠心力による移動状態下での濾過（即ち、平行濾過）の特徴が現われる。遠心力による粒子分離が進行すると共に垂直濾過の寄与が大きくなる。2 種の濾過方式を採用するために中空繊維内壁部で

激に低下する、好ましくは 30% 以上である。限外濾過速度に及ぼす面内空孔率の影響は、10% 未満では面内空孔率の約 5 乗、10~30% では約 2 乗、30% 以上では約 1 乗に比例して限外濾過速度は増加する。一方、面内空孔率が 80% を越えると、中空繊維の力学的性質は著しく低下し、ピンホール等の欠陥部が生じる恐れがある。同一の平均孔径および面内空孔率で限外濾過速度に及ぼす孔径分布の影響を検討した結果、 \bar{r}_4/\bar{r}_3 の値（ \bar{r}_3 は後述する 3 次の平均孔半径）が小さいほど限外濾過速度が大きくなる。しかも $\bar{r}_4/\bar{r}_3 \leq 1.3$ となると、微生物粒子の直径の 1.1 倍の平均孔径の中空繊維で被濾過流体を静止下で限外濾過（垂直濾過と略称）しても、濾液中には微生物粒子は殆んど観察出来ない。さらに被濾過流体を流動下で限外濾過（平行濾過と略称）すると $\bar{r}_4/\bar{r}_3 \leq 1.3$ であれば微生物粒子の直径の 1.2 倍の平均孔径の中空繊維を用いた場合、得られた濾液中には微生物粒子は殆んど観察できない。孔径分布の孔径の大きい部分でのすそひきをなくすれば、 \bar{r}_4/\bar{r}_3 は

の粒子あるいは被濾過流体中に溶解する高分子量物質（被濾過流体として血液を採用した場合は、タンパク質）による孔の目づまりが防止できる。

平行濾過と垂直濾過の効果が発揮できる形態として、多孔性中空繊維がほぼ放射線状に配置され円の中心より被濾過流体（例えば、血液）が供給され、中空繊維の他端の円の周辺部に血液成分を貯えつつ、血漿成分中のタンパク質を中空繊維によつて濾別し、微生物粒子の存在しない状態で回収すれば、輸血用あるいは分画用血漿が採集できる。

被濾過流体が血液の場合、粘度が高く、また遠心力あるいは静水圧により負荷できる圧力の限界値が存在する。そのため中空繊維を用いた血液の濾過では、用いる中空繊維として、内径が $200 \mu\text{m} \sim 1 \text{mm}$ 、壁厚が $5 \sim 50 \mu\text{m}$ 、中空繊維の長さが $5 \sim 20 \text{cm}$ であれば、濾過速度を大きくし、かつ溶血を防止する観点から好ましい。この際、中空繊維の本数として 10~20000 本を束ねた組立て単位（モジュール）で構成し、おのおのの組立て単位

の血液処理 200 ~ 500 ml にすれば輸血用血漿製剤を作製するのにさらに好ましい。このモジュールを2個直列に結合することにより、おのこのモジュールで限外濾過されて得られる濾液成分組成をかえることもできる。

本発明方法で使用する中空繊維として、中空繊維を構成するセルロース分子鎖の繊維軸方向への配向度が60%以上であることが好ましい。もしこの配向度が60%未満では、再生セルロース中空繊維は血液中で膨潤し、そのため中空繊維が変形するため、被濾過流体の流れが乱れ、目づまりが起りやすくなる。

本発明方法で採用される多孔性中空繊維の平均孔径 \bar{r}_4 、面内空孔率、 \bar{r}_4/\bar{r}_3 および配向度はそれぞれ以下の方法で決定される。

<平均孔径 \bar{r}_4 >、<面内空孔率>および< \bar{r}_4/\bar{r}_3 >；

中空繊維の壁部の断面を走査型電子顕微鏡で観察し、孔径の最小な部分を壁厚に対して誤差10%以内の範囲で決定する。この最小な部分を通つ

線は多数の孔を横切る。孔を横切つた際の孔内に存在する直線の長さを測定し、この頻度分布関数を求める。この頻度分布関数を用いて、例えば、ステレオロジ(例えば、諏訪紀夫著“定量形態学”岩波書店)の方法で $N(r)$ を定める。

<配向度>；

理学電機社製X線発生装置(RU-200PL)とゴニオメーター(SG-9R)、計数管にはシンチレーションカウンタ、計算部には波高分析器(PHA)を用い、ニッケルフィルターで単色化したCu-K α 線(波長 $\lambda = 0.1542$ nm)で対称透過法で測定した。中空繊維試料を平行に束ねて、X線入射方向に直角に理学電機社製の繊維試料測定装置(回転試料台)に固定した。スキヤング速度4°/分、チャート速度1 cm/分、タイムコンスタント1 ~ 2秒、ダイバージェントスリット2 mm ϕ 、レシービングスリット縦幅1.9 mm \times 横幅3.5 mm、温度30℃、相対湿度50%の条件下で、一定回折角度(回折角 $2\theta = 21.5^\circ$ 、(002)面の回折角に対応)で子午線から赤道線を経て再び子午線に

て中空繊維の繊維軸方向に平行に、厚さ約0.1 μ mの超薄切片を作成し、この切片の電子顕微鏡写真をとる。注目する切片の1 cm当りの孔半径が $r \sim r + dr$ に存在する孔の数を $N(r)dr$ と表示すると、3次および4次の平均孔径(それぞれ \bar{r}_3 および \bar{r}_4) および面内空孔率Prは次式で定義される。

$$\bar{r}_3 = \frac{\int_0^\infty r^3 N(r) dr}{\int_0^\infty r^2 N(r) dr} \quad (1)$$

$$\bar{r}_4 = \frac{\int_0^\infty r^4 N(r) dr}{\int_0^\infty r^3 N(r) dr} \quad (2)$$

$$Pr(\%表示) = \pi \int_0^\infty r^2 N(r) dr \quad (3)$$

\bar{r}_4/\bar{r}_3 は(1)、(2)式で得られた \bar{r}_3 、 \bar{r}_4 より直接算出される。平均孔径は $2\bar{r}_4$ で与えられる。孔径分布関数 $N(r)$ は以下のように超薄切片の電子顕微鏡写真より定める。

すなわち、孔径分布を求めたい部分の走査型電子顕微鏡写真を適当な大きさ(例えば、20 cm \times 20 cm)に拡大焼付けし、得られた写真上に等間隔にテストライン(直線)を20本描く。各々の直

至る180°の範囲の方位角方向のX線回折強度曲線を測定した。この曲線の半価幅H(度単位)を読取り、この値を(4)式に代入すれば配向度が算出できる。

$$\text{配向度}(\%表示) = (180 - H) / 180 \times 100 \quad (4)$$

実施例

以下の実施例において、本発明を具体的に説明する。

実施例1

セルロース銅アンモニウム原液をアセトン/アンモニウム/水系で構成される凝固浴中に吐出する方法(特開昭59-204912号公報)で得られた平均孔径0.063 μ m、面内空孔率36%、 $\bar{r}_4/\bar{r}_3 = 1.22$ 、内径300 μ m、壁厚20 μ mの銅安セルロース中空繊維を作製した。該中空繊維の配向度は65%であつた。この繊維を1000本束ねて、ポリカーボネート容器(円筒状)内部にウレタン系接着剤を用いて公知の方法で接着し、長さ20 cmの透析型人工腎臓と類似の液体分離器(モジュール)を作製した。該モジュールの中空繊維の繊維軸方向に

遠心力が負荷されるように該モジュールを遠心機内に設置した。該モジュールには被濾過液体の流入口および流出口を持ち、両流出口は中空繊維内部(中空部)へ通じる。一方の入口部より血液を流入する。この入口部は遠心力を与える回転軸の近傍にある。他方の出口部にはあらかじめ設定された体積を持つチューブまたは容器を接続している。このチューブまたは容器の体積は、血液のヘマトクリット値を $Ht\%$ 、該モジュールの充填体積を $V(ml)$ 、被濾過血液の体積を $V_f(ml)$ とすると、 $(0.008 Ht) V_f \sim (0.015 Ht) V_f (ml)$ の間にある。牛の血液を用い $V_f = 200 ml$ ($Ht = 40\%$) を採用し、該容器の体積を $80 ml$ とする。500 rpm 以下の回転下で牛の血液をモジュールの入口部より流入させる。200 ml 流入後、遠心機の回転数を 4000 rpm とし、約 30 分間濾過を続けた。血液の流入初期に得られる濾液(血漿の一部)中にはグロブリンとアルブミン濃度はいずれも血漿の平均濃度に比べて低かった。その後次第にそれらの濃度は上昇した。特にグロブリン濃度の上

昇率が大きかった。また濾液中には微生物粒子が存在していないことを電子顕微鏡で確認した。

一方、該モジュールを $121^\circ C$ 、15 分間加圧加熱蒸気滅菌を行なった。生理的食塩水中に 5.0×10^7 個/ml の濃度で大腸菌ファージ (IFO 20004) を分散し、 $20^\circ C$ で 0.3 気圧の加圧下で限外濾過した。得られた濾液中のファージ数を寒天重層法によるブラック形成法で評価した。その結果、ブラック数は零であり、本モジュールのファージ阻止率は 99.999999% 以上である。

実施例 2

実施例 1 と同様にして銅安セルローズ中空繊維を作製した。該中空繊維の平均孔径は $0.15 \mu m$ 、空孔率 56%、 $\bar{r}_4/\bar{r}_3 = 1.21$ 、内径 $300 \mu m$ 、壁厚 $22 \mu m$ である。一方、市販の酢酸セルローズ中空繊維(公称平均孔径 $0.2 \mu m$ 、面内空孔率 10% 未満、 \bar{r}_4/\bar{r}_3 は測定不可能)を用いて実施例 1 と同様に血漿分離実験を実施した。その結果、銅安セルローズ中空繊維の方が濾過速度が約 2 倍、濾液中のタンパク質濃度も高く、滲血は酢酸セルロ

発明の効果

本発明の血漿分離方法によれば、次の顕著な効果が得られる。

- (イ) 回収される血漿タンパク質中にはウイルス粒子が存在せず、そのため、加熱滅菌処理を必要としない。
- (ロ) 平行濾過と垂直濾過の 2 種の濾過方式を採用するために、中空繊維内壁部での粒子あるいは被濾過流体中に溶解する高分子塩物質による孔の目づまりが防止できる。
- (ハ) モジュールと直列に結合することにより、各々のモジュールでの濾液成分組成を変えることができる。
- (ニ) タンパク質の回収率が高い。

特許出願人 旭化成工業株式会社